

Молекулярно-биологические методы определения аэросаккулитов и аденовирусов у птиц

Сентябрь-Октябрь 2020

Материал для сайта www.svetmix.com

1. Аэросаккулиты птицы и их определение

Дыхательные пути птиц являются частым местом проникновения патогенов и заболеваний, включая болезнь Ньюкасла, инфекционный бронхит и птичий грипп. Лечение и профилактика респираторных инфекций имеют первостепенное значение для отрасли не только потому, что они оказывают разрушительное воздействие на птичий стада, но также делают их иммуносупрессивными и чувствительными к оппортунистическим инфекциям, таким как колибактериоз. Поэтому бройлеры и куры-несушки подлежат режимам интенсивной вакцинации, и стандартный путь вакцинации - спрей или капли для глаз / носа. Было показано, что изменения в составе респираторной микробиоты млекопитающих связаны с различными респираторными заболеваниями и вакцинацией против конкретных респираторных патогенов [Glendinning 2017].

Аэросаккулит – это инфекционная болезнь органов дыхания у птиц, преимущественно у голубей, причем наиболее предрасположен молодняк. Болезнь протекает одновременно с воспалением других органов дыхания – легких, бронхов, трахеи. Аэросаккулит встречается также и сельскохозяйственной птицы.

Аэросаккулит может развиваться как самостоятельное заболевание из-за простуды, переохлаждения, неправильного содержания, наличия грязи и пыли, которая может быть причиной и переносчиком заболевания. Также аэросаккулит может развиваться во время инфекционных заболеваний птицы таких как ларинготрахеит, респираторный микоплазмоз, инфекционный бронхит и др.

Основные признаки аэросаккулита – потеря массы, у молодняка наблюдается задержка в росте, воспаления слизистых подглазничных синусов, проявляются общие признаки хронических заболеваний органов дыхания. У птицы затруднено дыхание, слышатся хрипы, кашель. Птицы быстро утомляются, часто спят, при этом температура тела падает. В некоторых случаях болезнь может не проявляться внешне со стороны болезни органов дыхания. При отсутствии своевременной терапии заболевание может осложниться такими заболеваниями как перигепатитом, перитонитом, перикардитом. Во время болезни у птицы утолщаются стенки воздухоносных мешков, в которых появляется серозно-фибринозный экссудат.

Установить больна ли птица возможно, если птицу приложить спиной к уху и прослушать дыхание. Если будут слышны хрипы, то необходимо провести лабораторные и рентгеновские исследования.

Для профилактики развития аэросаккулита необходимо соблюдать санитарные нормы содержания птиц, следить за температурой воздуха.

Для лечения аэросаккулита рекомендуется применять антибиотики, этазол, норсульфазол, стрептомицин (добавлять в питьевую воду) и др.

Распространенными возбудителями инфекций дыхательных путей является *микоплазма*. Основные виды патогенных микоплазм, выделенные от домашних птиц, включают *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) и *M. iowae* (MI) [Stipcovitz 1996]. MG вызывает хронические респираторные заболевания кур и инфекционный синусит у индеек, что приводит к экономическим потерям. Наиболее распространенным возбудителем аэросаккулита у кур и цыплят-бройлеров является микоплазма (*M. synoviae*). Ее выделяют у птиц с аэросаккулитом [Kleven 1972, 1978, Stipkovits. 1996, Lockaby 1998]. MS вызывает инфекционный синовит, аэросаккулит или легкое заболевание верхних дыхательных путей. *Mycoplasma synoviae* (MS) представляет собой серьезную проблему в птицеводстве и влияет на мировое производство кур и индеек. MM более специфична для индеек, вызывая аэросаккулит, снижение продуктивности и яйценоскости. MI связана с пониженной яйценоскостью у индейки. Заражение микоплазмой происходит либо прямым путем от птицы к птице или через яйцо, либо косвенно. **Диагностика основана на выделении и идентификации микоплазм при помощи биохимических, серологических и молекулярно-биологических тестов, серологических исследованиях сыворотки крови организма-хозяина с помощью тестов на агглютинацию на предметных стеклах, ингибирования гемагглютинации или иммуноферментного анализа (ELISA).** Антибиотики (например, тетрациклины, макролиды, хинолоны и тиамулин) могут использоваться для терапевтического лечения и/или профилактического лечения. Устранение микоплазменной инфекции может быть достигнуто за счет улучшения гигиены и технических условий содержания птицы, терапевтического лечения кур-несушек родительского стада и/или инкубационных яиц и улучшения процедур мониторинга.

В числе молекулярно-биологических методов для определения микоплазмы применяется метод ПЦР, начиная с еще более ранних исследований [Lockaby 1998, Lauerman 1993] и он показал себя как эффективный для анализа *M. Synoviae*, в том числе при аэросаккулитах.

Проведенное Glendinning [Glendinning 2017] исследование показывает, что использование анализа гена 16S рРНК для изучения респираторной микробиоты цыплят может позволить нам обнаружить присутствие бактерий, которые могут быть пропущены в исследованиях на основе культур. Он обеспечивает основу, на которой могут быть построены будущие исследования, и **демонстрирует различия между респираторной микробиотой цыплят в разном возрасте.**

Хотя присутствие стафилококков, лактобацилл и представителей Enterobacteriaceae соответствует предыдущим

результатам исследований на основе культур, мы идентифицировали несколько бактерий, содержание которых составляло $\pm 5\%$ по крайней мере в одном из наших респираторных образцов, которые ранее не были идентифицированы в большом количестве в культуральных исследованиях. К ним относятся несколько бактерий, которые ранее были обнаружены в составе микробиоты кишечника цыплят, такие как *Faecalibacterium*, *Enterococcus cecorum*, *Turicibacter* и *smb53*, а также бактерии, которые ранее были выделены из воздуха птичника, такие как как *Jeotgalicoccus*. Некоторые из выделенных нами бактерий также были обнаружены в предыдущем исследовании жидкости BAL кур с использованием анализа гена 16S рНК, включая *Gallibacterium*, *Avibacterium*, *Acinetobacter* и *Staphylococcus*.

Для определения различных штаммов MS обычно применяются методы культивирования MS, серологические анализы и обычные ПЦР или ПЦР в реальном времени [Lauerman 1993, Hong 2004, Hess 2007, Dijkman 2013]. Однако культивирование очень трудоемко, требует много времени и требует специальной питательной среды и инкубации [Ratliff 2014]. ПЦР - высокоспецифичный и чувствительный метод, но требует как минимум нескольких часов, а для визуализации результатов необходим электрофорез. Мультиплексная ПЦР является ценным инструментом для обнаружения или дифференциации MG и MS у кур [Hess 2007, Hammond 2009; Kursa 2015]. Более того, используя метод ПЦР и ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP), нацеленный на однокопийный домен N-концевой области *vlhA*, можно дифференцировать полевые изоляты MS от вакцинного штамма MS-H [Bayatzadeh et al. 2014].

Метод LAMP

Для определения *M. synoviae* применяется метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) ДНК. Целью этого исследования была разработка LAMP для простого и недорогого определения штаммов MS у домашней птицы с использованием специально разработанных праймеров, нацеленных на ген гемагглютина А (*vlh*).

Основываясь на межгенной спейсерной области 16S-23S рНК можно количественно определить количество копий MS в образцах, собранных из куриных суставов, с использованием специфической техники qPCR [Raviv and Kleven 2009; Dijkman et al. 2013]. Привлекательной альтернативой традиционным методам обнаружения MS является LAMP, которая проста в настройке и не требует дополнительных термоциклеров [Wozniakowski 2012]. Аналитическая чувствительность LAMP достигла десяти копий ДНК на 1 мл, что в 1000 раз выше, чем при обычной ПЦР.

Анализ проводили на водяной бане в течение 1 ч при 63 ° C. Результаты были визуализированы после добавления флуоресцентного красителя SYBR Green®. LAMP был специфичен исключительно для MS без перекрестной

реактивности с другими видами микоплазмы. Чувствительность к LAMP была определена как 10-1 КОЕ / мл и была в 1000 раз выше, чем у MS-специфической полимеразной цепной реакции. Анализ LAMP был проведен на 18 полевых штаммах MS, чтобы гарантировать его надежность и полезность. Это первый отчет о разработке и применении LAMP для быстрого обнаружения PC, изолированного от кур. Этот простой метод может применяться диагностическими лабораториями без доступа к дорогостоящему оборудованию.

В проведенном Glendinning исследовании метод LAMP показал себя очень чувствительным к обнаружению 10^{-1} КОЕ / мл стандартного штамма MS. Проведенное исследование по разработке LAMP для идентификации MS является дополнительным доказательством полезности этого метода как быстрого и очень чувствительного метода для обнаружения *Mycoplasma ssp.* Разработанная LAMP оказалась мощным и надежным методом специфического и селективного обнаружения *M. synoviae*. Используя конкретную область гена *vlhA*, можно селективно амплифицировать ДНК MS без перекрестных реакций в других образцах, содержащих ДНК *Mycoplasma ssp.* LAMP метод в том числе представляет собой полезную альтернативу для местных ветеринаров и небольших ветеринарных лабораторий, не имеющих доступа к методике ПЦР.

2. Аденовирусы птицы и их определение

Аденовирусы птиц (FAdV) широко распространены среди кур. Аденовирусы вызывают остро протекающее заболевание, преимущественно молодняка птиц, сопровождающееся поражением печени (гепатитами), анемией, геморрагиями в мышцах, а также снижением яйценоскости, уменьшением массы яиц, истончением скорлупы и неспособности эмбрионов к развитию.

Возбудителем аденовируса является ДНК-содержащий вирус семейства *Adenoviridae*. Представлен тремя различными в антигенном отношении вирусами. В настоящее время насчитывается 12 серотипов аденовирусов, относящихся к группам Celo, Gal и 1 тип EDS – 76 (синдром снижения яйценоскости). Наиболее патогенными является серотип 5 (Celo), который поражает молодняк.

Обнаружение FAdV различными методами в связи с их большой распространенностью у птицы изучается уже более двух десятилетий и основном осуществляется путем выделения вируса, серологических анализов, различных анализов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и изотермической амплификации с использованием петли (LAMP).

До сих пор методы обнаружения FAdV основывались на выделении вируса в фибробластах куриного эмбриона (CEF), клетках печени куриного эмбриона (CEL), клетках почек куриного эмбриона (CEK), клеточной линии куриной гепатомы (LMH) или специфических клетках беспатогенных (SPF) куриных эмбрионов [McConnell 2008], или инокуляция цыплят SPF с разными

серотипами. Антитела к FAdV также могут быть обнаружены в сыворотке с помощью серологических анализов, включая анализ преципитации в агаровом геле (AGP), серонейтрализацию вируса (SN) и ELISA [Mockett 1983, Philippe 2007]. Специфические коммерческие антитела доступны только против FAdV-1, FAdV-3 и FAdV-5 или FAdV неопределенного серотипа. Антитела IgG против серотип-специфичных и группоспецифичных антигенов аденовируса птиц серотипов FAdV-2, 3 и 4 были идентифицированы с помощью ELISA.

В последние годы для обнаружения и идентификации аденовирусов все более используются молекулярно-биологические методы, основанные на ПЦР, такие как рестрикционный эндонуклеазный анализ (REA) гибридизация *in situ* с использованием ДНК-зондов, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени и ПЦР в реальном времени Gunes, 2012 г. В том числе и для количественного определения различных видов FAdV (AE).

За прошедшие 15 лет было разработано несколько видов ПЦР-анализов для выявления представителей разных видов и серотипов FAdV, включая ПЦР в сочетании с анализом рестрикционных ферментов T-RFLP [Meulemans 2001]. Методы, основанные на ПЦР, полезны и позволяют идентифицировать несколько серотипов FAdV [Caterina 2004, Günes 2012]. Впервые ПЦР для обнаружения генов рIIIа и рIII серотипов FAdV-8 и FAdV-1 была описана Jiang 1999 [Jiang 1999], также были разработаны тесты вложенной ПЦР на основе гена полимеразы и дуплекс-анализа. Также были разработаны ПЦР-тесты для обнаружения серотипов FAdV-1 и FAdV-5 [Niczyporuk 2010-2015]. Была также разработана ПЦР, нацеленная на ген гексона [Meulemans 2001]. Кроме того, было показано, что ПЦР в реальном времени является полезным инструментом для обнаружения представителей пяти видов FAdV (A-E) [Günes 2012].

Методы ПЦР для определения аденовирусов птицы.

Мультиплексная полимеразная цепная реакция (mPCR) была разработана и оптимизирована для одновременного обнаружения и дифференциации птичьего реовируса (ARV), птичьего аденовируса группы I (AAV-I), вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV) и вируса куриной анемии (CAV) [Caterina 2004]. В этом тесте для ARV, AAV-I, IBDV и CAV использовали четыре набора специфических олигонуклеотидных праймеров. Продукты mPCR ДНК были визуализированы с помощью гель-электрофореза и состояли из фрагментов длиной 365 п.н. для IBDV, 421 п.н. для AAV-I, 532 п.н. для ARV и 676 п.н. для CAV. Метод mPCR, разработанный в этом исследовании, оказался чувствительным и специфичным. Обнаружение продуктов ДНК, амплифицированных с помощью ПЦР, составляло 100 пг как для CAV, так и для IBDV и 10 мкг для ARV и AAV-I, и эта mPCR не амплифицировала нуклеиновые кислоты от других протестированных птичьих патогенов. Метод mPCR продемонстрировал аналогичную чувствительность в тестах с использованием экспериментальных образцов фекальных клоакальных мазков, в которые были добавлены ARV-препараты, AAV-1, IBDV и CAV, и взятые у кур, не содержащих специфических патогенов (SPF). Эта mPCR

выявляла и дифференцировала различные комбинации матриц РНК / ДНК из APV, AAV-I, SAV и IBDV без уменьшения амплификации с фекалиями.

Позднее были разработаны методики ПЦР в реальном времени, подходящие для всех 5 видов куриного аденовируса (FAdV) с увеличенной чувствительностью. Для определения вирусной контаминации отбирают клоакальные мазки и образцы тканей [Gunes 2012].

Günes et al описывает разработку ПЦР, основанную на SYBR Green полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР в реальном времени) для обнаружения и количественного определения всех видов аденовируса птиц (FAdV). Праймеры были созданы на основе консервативных нуклеотидных последовательностей в гене 52К. Десятикратные серийные разведения векторной ДНК использовали в качестве стандарта для количественного определения. ПЦР в реальном времени имела эффективность 98%, значение квадрата регрессии 0,999 и показало диапазон $6,73-6,73 \times 10^8$ копий ДНК FAdV на реакцию. Анализ был высокоспецифичным для FAdV, и с его помощью возможно точное количественное определение всех 5 видов FAdV (от FAdV-A до FAdV-E). Было показано, что двенадцать серотипов FAdV (от FAdV-1 до 8a и от 8b до 11) поддаются обнаружению и количественной оценке. Другие вирусные геномы, а также неинфицированные клетки печени куриного эмбриона (CEL) не давали положительного сигнала. Клоакальные мазки были взяты во время эксперимента на животных, который проводился со всеми видами FAdV. Выделение FAdV исследовали в культуре клеток с помощью стандартной ПЦР и разработанной ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени оказалась более чувствительной, чем ПЦР на культуре клеток и обычная ПЦР. Обнаружение и количественное определение FAdV в различных типах образцов стало возможным с помощью новой ПЦР в реальном времени.

В исследовании проведенном Chen et al [Chen 2018] в Китае ПЦР было выделено 155 штаммов FAdV от больных кур в период с 2015 по 2018 год. Анализ ПЦР показал, что 123 образца принадлежали к FAdV вида С, 27 - к FAdV вида Е и пять содержали два разных штамма FAdV. Филогенетический анализ показывает, что эти последовательности гексоновых областей были сгруппированы в три отдельных серотипа: FAdV-4 (79,4%, 123/155), FAdV-8a (13,5%, 21/155) и FAdV-8b (3,9%, 6 / 155), из которых FAdV-4 был доминирующим серотипом в Китае. Данные результаты предоставили четкую картину генетической эпидемиологии FAdV, циркулирующей в Китае в течение 2015–2018 годов, и полезны для профилактики FAdV.

Метод RT-ПЦР для определения аденовирусов птицы

В исследовании Romanova et al [Romanova 2009] разрабатывали высокочувствительный метод анализа на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-ПЦР) для обнаружения и количественного определения ДНК аденовируса птицы (FAdV) в тканях цыплят с использованием FAdV-9 в качестве модели. Для данного анализа характерен динамический диапазон 7 log и минимальный предел обнаружения 9,4 копий

вирусного генома. Было показано, что данный метод обладает высокой специфичностью, поскольку ткани неинфицированных цыплят и другие вирусные геномы, такие как геномы вируса болезни Марека, вируса оспы птиц и вируса инфекционного ларинготрахеита, не давали положительного сигнала. Чувствительность RT-ПЦР была сопоставима с вложенной ПЦР, и она была в 100 раз более чувствительной, чем обычная ПЦР.

Анализ был подтвержден тестированием ДНК из тканей цыплят, инфицированных FAdV-9, собранных в разные дни после заражения. ДНК FAdV-9 была обнаружена в печени, сумке Фабрициуса и тканях миндалина слепой кишки в диапазоне 102–107 копий на 100нг общей ДНК. Большое количество вирусной ДНК присутствовало в миндалинах слепой кишки в течение недели после инокуляции, что делало эту ткань идеальным источником образцов для диагностики инфекции FAdV. Метод RT-ПЦР анализа является отличным инструментом для исследования и диагностики аденовирусов птицы, который обеспечивает высокую чувствительность, специфичность и быстрый анализ после ПЦР.

Методы кросс-прайминг амплификации (CPA) для определения аденовирусов птицы.

Для повышения диагностических возможностей применяемых в настоящее время методов, был разработан еще один вид современного анализа – метод кросс-прайминг-амплификация (CPA). Единичный анализ CPA для обнаружения гена гексона FAdV был оптимизирован для обнаружения всех серотипов 1-8a-8b-11, представляющих вид птичьего аденовируса А-Е [Niczyporuk 2015]. Оптимальная температура и время инкубации были определены как 68 ° С в течение 2 часов. Используя разные температуры инкубации, можно было дифференцировать некоторые серотипы FAdV. Результаты регистрировали после добавления красителя SYBR Green I^o, который давал зеленоватую флуоресценцию в УФ-свете. Продукты CPA, разделенные с помощью гель-электрофореза, показали разные «лестничные» модели для разных серотипов. Утверждение было специфичным для всех серотипов FAdV, и перекрестной реактивности не наблюдалось с представителями рода Atadenovirus, атаденовирусом утки А (вирус синдрома падения яйца EDS-76 [EDSV]) или контрольными образцами, содержащими вирус болезни Марека. (MDV), вирус инфекционного ларинготрахеита (ILT^v) или вирус куриной анемии (CAV).

В проведенных исследованиях праймеры были основаны на консервативных нуклеотидных последовательностях в гене 52 К с эффективностью 98% и значениями квадрата регрессии $R^2 = 0,999$. Различные виды ПЦР в реальном времени и последующий анализ кривой плавления с высоким разрешением (HRM) области гексона длиной 191 п.н. и анализ рестрикционного фермента были выполнены Стиром [66] для дифференциации всех видов FAdV, и было обнаружено, что профили кривой плавления соответствуют в основном связаны с составом GC и распределением по ампликонам. Анализ кривой плавления с высоким

разрешением (HRM) [60, 67] был разработан и применен как специфический, чувствительный и эффективный метод обнаружения без перекрестной реактивности. В последние годы были разработаны новые эффективные и чипсетные методы, такие как петлевая изотермическая амплификация (LAMP) или кросс-прайминг-амплификация (CPA) по Niczyporuk.

Результаты разработанного FAdV-CPA сравнивали с результатами ПЦР в реальном времени. Чувствительность CPA была равна чувствительности ПЦР в реальном времени и достигала $10^{-2,0}$ TCID₅₀, но метод CPA был более быстрым и дешевым, чем системы ПЦР. Метод CPA - очень специфичный, чувствительный, эффективный и быстрый инструмент для определения всех серотипов FAdV, основанный на изотермической амплификации нуклеиновых кислот. CPA катализируется Bsm, Полимеразой Bst или GspSSD и не требует начальной стадии денатурации или других ферментов.

Результаты проведенного исследования также показывают, что CPA - это специфичный метод обнаружения для всех серотипов FAdV и потенциально может применяться для различения связанных различных серотипов вируса на основе того наблюдения, что каждый серотип характеризуется лестничным узором из полос на геле. CPA может выполняться без всякого специального лабораторного оборудования. В проведенном исследовании метод CPA был использован для обнаружения 30 полевых штаммов аденовирусов представляет семь серотипов, обнаруженных у домашней птицы на ферме в Польше. При проведении метода CPA при разных исходных условиях реакции можно различить отдельные серотипы FAdV.

Такой метод CPA позволяет обнаружить $10^{-5,0}$ TCID₅₀ / мл вируса с титром $10^{3,0}$ TCID₅₀, и он более чувствителен, чем ранее описанный FAdV-LAMP, который может обнаруживать $10^{-4,0}$ TCID₅₀ / мл вируса с титром $10^{3,0}$ TCID₅₀ [Niczyporuk 2014]. Более того, такой CPA имеет ту же чувствительность, что и ранее описанная ПЦР в реальном времени [Niczyporuk 2015]. Время реакции метода кросс-прайминг-амплификации (CPA) составило 2 часа, и позволило выявить до 100 копий вируса. Поэтому он кажется очень подходящим для обнаружения ДНК FAdV в полевых условиях и, следовательно, имеет большую диагностическую ценность. Метод CPA оказался быстрым и очень чувствительным инструментом, который может использоваться плохо оборудованными лабораториями. Оцениваемый метод CPA может быть использован даже в мобильных лабораториях и небольших ветеринарных диагностических центрах [Niczyporuk 2015].

Резюме

Аэросаккулиты птицы

Наиболее распространенным возбудителем аэросаккулита у кур и цыплят-бройлеров является микоплазма (*M. Synoviae*, MS). MS вызывает инфекционный синовит, аэросаккулит и заболевания верхних дыхательных путей. (MS) представляет собой серьезную проблему в птицеводстве и влияет на мировое производство кур и индеек. Среди современных методов

определения MS – молекулярно-биологические методы различных видов ПЦР, в том числе RT-ПЦР, а также метод петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP). Методы ПЦР являются классическими и обладают широкими возможностями для стационарных лабораторий и больших исследований, тогда как LAMP представляет собой полезную альтернативу для местных ветеринаров и небольших ветеринарных лабораторий, не имеющих доступа к методике ПЦР.

Аденовирусы птицы

Ранняя диагностика имеет решающее значение для борьбы с инфекциями аденовирусов птицы (FAdV). Классические вирусологические методы, такие как выделение вируса в куриных эмбрионах SPF или в культуре клеток, достаточно трудоемки и требуют много времени. Несмотря на это, они все еще используются в качестве «золотого стандарта» [Niczyporuk 2015]. Обнаружение FAdV различными методами в связи с их большой распространенностью у птицы изучается уже более двух десятилетий и в основном осуществляется путем выделения вируса, серологических анализов, различных анализов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и изотермической амплификации с использованием петли (LAMP).

Наиболее современными методами являются молекулярно-биологические методы основанные на ПЦР, а также метод кросс-прайма амплификации (CPA), особенно актуальный для полевых условий и мобильных лабораторий.

Литература:

Аэрсаккулиты:

1. Bayatzadeh MA, Pourbakhsh SA, Ashtari A, Abtin AR, Abdoshah M (2014) Molecular typing of Iranian field isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vac- cine strain MS-H using *vlhA* gene. Br Poult Sci 55:148–156 -ABS.
2. Dijkman R, Feberwee A, Landman WJ (2013) Validation of a previously developed quantitative polymerase chain reaction for the detection and quantification of *Mycoplasma synoviae* in chicken joint specimens. Avian Pathol 42:100–107
3. Glendinning L, McLachlan G, Vervelde L (2017) Age-related differences in the respiratory microbiota of chickens. PLoS ONE 12(11): e0188455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188455>.
4. Hammond PP, Ramírez AS, Morrow CJ, Bradbury JM (2009) Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. Vet Microbiol 136:61–68.-ABS
5. Hess M, Neubauer C, Hackl R (2007) Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. Avian Pathol 36:127–133 .
6. Hong Y, Garcia M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH (2004) Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. Avian Dis 48:606–616
7. Kleven SH, Fletcher OJ, Davis RB (1975) Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. Avian Dis 19:126–135
8. Kleven, S. H., et al. “Airsacculitis Induced in Broilers with a Combination of *Mycoplasma Gallinarum* and Respiratory Viruses.” *Avian Diseases*, vol. 22, no. 4, 1978, pp. 707–716. JSTOR, www.jstor.org/stable/1589648. Accessed 29 Sept. 2020.

9. Kleven, Stanley H., et al. "Airsacculitis in Broilers from *Mycoplasma Synoviae*: Effect on Air-Sac Lesions of Vaccinating with Infectious Bronchitis and Newcastle Virus." *Avian Diseases*, vol. 16, no. 4, 1972, pp. 915–924. *JSTOR*, www.jstor.org/stable/1588772. Accessed 29 Sept. 2020.
10. Kursa, O., Woźniakowski, G., Tomczyk, G. *et al.* Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* by loop-mediated isothermal amplification. *Arch Microbiol* **197**, 319–325 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1063-2>
11. Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, van Santen VL (1993) Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis* 37:829–834
12. Lockaby SB, Hoerr FJ, Lauerman LH, Kleven SH. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. *Veterinary Pathology*. 1998;35(3):178-190. doi:10.1177/030098589803500303.
13. Raviv Z, Kleven SH (2009) The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Dis* 53:103–107
14. Russell, S.M. The Effect of Airsacculitis on Bird Weights, Uniformity, Fecal Contamination, Processing Errors, and Populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli* / S.M. Russell // 2003 Poultry Science 82:1326–1331.
15. Stipkovits L, Kempf I. Mycoplasmoses in poultry. *Rev Sci Tech*. 1996 Dec;15(4):1495-525. doi: 10.20506/rst.15.4.986. PMID: 9190023.
16. Woźniakowski G, Kozdrun W, Samorek-Salamonowicz E (2012) Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virol J* 9:110.

Аденовирусы птицы:

17. Caterina KM, Frasca S Jr, Girshick T, Khan MI. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. *Mol Cell Probes*. 2004 Oct;18(5):293-8. doi: 10.1016/j.mcp.2004.04.003. PMID: 15294316.
18. Chen, L., Yin, L., Zhou, Q. *et al.* Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015–2018. *BMC Vet Res* **15**, 271 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1969-7>.
19. Günes A, Marek A, Grafl B, Berger E, Hess M. Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *J Virol Methods*. 2012 Aug;183(2):147-53. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.04.005. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22561984.
20. Harrach B, Kajań GL (2011) Aviadenovirus. Adenoviridae. In: Tidona CA, Darai G (eds) Springer Index of Viruses. Springer, New York, pp 13–28.
21. Jiang P, Ojkić D, Tuboly T, Huber P, Nagy E (1999) Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses. *Can J Vet Res* 63:124–128.
22. McConnell BA, Fitzgerald AS (2008) Group I adenovirus infections. In: Saif YM (ed) Diseases of poultry, 12th edn. Blackwell Publishing Professional, Iowa State Press, Ames, pp 252–266
23. McFerran JB, Smyth JA. Avian adenoviruses. *Rev Sci Tech*. 2000 Aug;19(2):589-601. PMID: 10935281.
24. Meulemans G, Boschmans M, Van Den Berg TP, Decaesstecker M (2001) Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 30:655–660
25. Mockett AP, Cook JK (1983) The use of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect IgG antibodies to serotype-specific and group-specific antigens of fowl adenovirus serotypes 2, 3 and 4. *J Virol Methods* 7:327–335
26. Niczyporuk JS (2014) Molecular characteristic on occurrence of fowl adenovirus field strains and effect of efficiency on prophylactic vaccinations against Marek's disease. Doctoral dissertation, National Veterinary Research Institute, Pulawy.
27. Niczyporuk JS. Molecular characterisation of fowl adenovirus type 7 isolated from poultry associated with inclusion body hepatitis in Poland. *Arch Virol*. 2017;162(5):1325-1333. doi:10.1007/s00705-017-3240-5.
28. Niczyporuk, J.S. (September 5th 2018). Adenoviruses and Their Diversity in Poultry, Application of Genetics and Genomics in Poultry Science, Xiaojun Liu, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.77131. Available from: <https://www.intechopen.com/books/application-of-genetics-and-genomics-in-poultry-science/adenoviruses-and-their-diversity-in-poultry>

29. Niczyporuk, J.S., Woźniakowski, G. & Samorek-Salamonowicz, E. Application of cross-priming amplification (CPA) for detection of fowl adenovirus (FAdV) strains. *Arch Virol***160**, 1005–1013 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2355-9>.
 30. Philippe C, Grgic H, Ojkic D, Nagy E (2007) Serologic monitoring of a broiler breeder flock previously affected by inclusion body hepatitis and testing of the progeny for vertical transmission of fowl adenoviruses. *Can J Vet Res* 71:98–102
 31. Rehman LU, Sultan B, Ali I, et al. Duplex PCR assay for the detection of avian adenovirus and chicken anemia virus prevalent in Pakistan. *Virology* 2011;8:440. Published 2011 Sep 19. doi:10.1186/1743-422X-8-440
 32. Romanova N, Corredor JC, Nagy E. Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2009 Jul;159(1):58-63. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.02.026. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19442846.
- //